

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 358 394

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 77 21728

(54) Nouveaux esters de l'hydroxysuccinimide, des procédés pour leur fabrication et leur utilisation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). C 07 D 207/46; C 07 G 7/00.

(22) Date de dépôt 13 juillet 1977, à 15 h 49 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en République Fédérale d'Allemagne le
14 juillet 1976, n. P 26 31 656.3 au nom de la demanderesse.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 6 du 10-2-1978.

(71) Déposant : Société dite : BOEHRINGER MANNHEIM G.M.B.H., résidant en République
Fédérale d'Allemagne.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud.

L'invention, due à Hans Georg BATZ, Jürgen HORN, Klaus STELLNER, Josef MAIER, Michael NELBOECK-HOCHSTETTER, Günter WEIMANN, a pour objet de nouveaux dérivés, esters de l'hydroxy-succinimide, des procédés pour leur fabrication et leur utilisation pour l'obtention de liaisons covalentes de protéines, en particulier de protéines biologiquement actives, en vue de réaliser la réticulation ou la fixation sur support.

L'intérêt apporté aux protéines à activité enzymatique, immobilisées et en particulier, liées à des supports, s'accroît constamment dans de nombreuses branches de la technique. On connaît déjà, par exemple grâce à la demande de brevet DT publiée après examen DT-AS 21 28 743 et la demande de brevet DT publiée avant examen DT-OS 22 60 185, plusieurs procédés pour obtenir la liaison covalente de protéines avec des substances-supports. Les raisons les plus importantes de l'intérêt apporté aux enzymes immobilisées sont la stabilisation ainsi provoquée de la substance biologiquement active, et la possibilité de la séparer facilement des milieux réactionnels aqueux.

Dans les procédés les plus anciens pour lier de façon covalente des protéines biologiquement actives, on utilise principalement l'introduction de groupes activants dans la matrice-support. Un inconvénient important de ces méthodes réside dans les faibles rendements en activité attribués à une influence sur la configuration active de la protéine par suite du voisinage immédiat de la matrice-support. On a donc cherché à éliminer cet inconvénient en intercalant entre la protéine et le support, des éléments d'espacement ("spacer" ; formateurs de ponts).

Ces éléments d'espacement dérivent de composés formateurs de ponts, pour lesquels il s'agit généralement de composés homo- ou hétérodifonctionnels, présentant, d'une part, une fonction réactive avec la protéine en solution aqueuse, qui conduit à la formation d'une liaison covalente, et d'autre part, une autre fonction appropriée à la formation de la liaison avec le support. Dans les formateurs de ponts homodifonctionnels, tels que le dialdéhyde glutarique ou les diépoxydes, les deux groupes fonctionnels sont identiques.

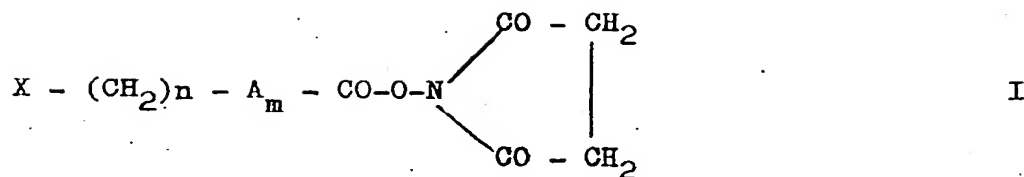
La protéine et le support réagissent par conséquent en même temps, de sorte qu'il se produit conjointement non seulement une réticulation de protéine, mais aussi une liaison avec le support. Des procédés avantageux s'avèrent être ceux où

l'on opère en deux stades, avec liaison de la molécule du formateur de pont, tout d'abord avec la protéine ou avec le support, puis avec le support et éventuellement la protéine. Pour ce procédé, les composés formateurs de ponts hétérodifonctionnels avec deux groupes fonctionnels différents, de réactivité différente, se montrent plus avantageux.

Il est connu, par ailleurs, d'effectuer tout d'abord, une adsorption, physiquement sur les surfaces de supports appropriés, puis de réaliser la fixation sur ces surfaces, par réticulation avec des formateurs de ponts polyfonctionnels.

Dans le cas de ce procédé, on a constaté que des composés différents formateurs de ponts, se comportaient tout à fait différemment, suivant la protéine à lier, et suivant la substance-support à utiliser, et conduisaient à des résultats par trop différents. Dans la pratique, on devait donc chercher, au moyen d'essais préliminaires, quelle était dans chaque cas particulier, la substance génératrice de ponts la plus avantageuse. Dans certains cas, des formateurs de ponts se révélaient particulièrement appropriés et, dans d'autres cas, totalement insuffisants. Dans un grand nombre de cas, on n'est pas encore du tout parvenu à réaliser une liaison covalente satisfaisante de protéines actives. Il existe donc actuellement, comme auparavant, une nécessité de disposer de composés supplémentaires formateurs de ponts fournissant une autre alternative de liaison covalente de protéines biologiquement actives, et en particulier d'enzymes. Avant tout, il existe un besoin en composés formateurs de ponts, pouvant être homodifonctionnels ou hétérodifonctionnels, présentant des groupes fonctionnels réagissant particulièrement rapidement et avec ménagement avec les protéines, pour lesquels la distance entre les groupes fonctionnels est d'une grandeur telle que les variations de conformation de la protéine liée par le support soient largement exclues et pour lesquels le "pont" reliant les deux groupes fonctionnels puisse être modifié à volonté, eu égard à leurs propriétés hydrophobes ou hydrophiles. L'invention a en conséquence pour but de fournir de tels composés.

Ce but est atteint grâce aux dérivés, esters de l'hydroxysuccinimide selon l'invention, de formule générale I



5

dans laquelle X représente un autre groupe ester carboxy-succinimide ou un radical de formule générale :



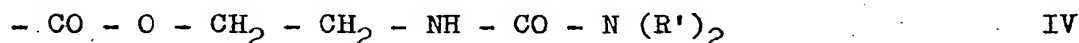
10

ou



15

ou



20

A est un groupe $- O - CH_2 - CH_2 -$, lorsque n est égal à 2 et X est un autre groupe ester carboxysuccinimide et, sinon une liaison simple,

n est un nombre entier ayant une valeur de 2 à 7,
m est le nombre 1, 2, 3 ou 4,

25

R est un atome d'hydrogène, un groupe méthyle ou cyanure, et R' est un groupe méthyle ou éthyle.

30

Suivant la nature du radical X, il s'agit de composés homodifonctionnels ou hétérodifonctionnels. Par variation de m et n, il est possible d'obtenir "sur mesure", le degré déterminé voulu, d'hydrophobie ou d'hydrophilie du pont. Alors les propriétés hydrophobes augmentent lorsque n croît et les propriétés hydrophiles augmentent lorsque m croît. Lorsqu'on désire obtenir une réticulation des protéines, on utilise de préférence les composés homodifonctionnels selon l'invention, et lorsqu'on recherche une liaison avec un produit-support solide ou liquide, on utilise par contre, de préférence, les composés hétérofonctionnels dans lesquels X représente un radical de formule II, III ou IV. Si la liaison avec le support s'effectue alors par copolymérisation, les composés dans lesquels X correspond à la formule III, conviennent particulièrement. Le groupe ester de l'hydroxy-

40

succinimide (radical HO-Su) réagit en solution aqueuse, de fa-

çon sélective avec les amines et est donc particulièrement approprié pour la liaison covalente des protéines.

Conformément à l'invention, la fabrication des nouveaux composés de formule générale I peut se faire :

5 a) par transformation de l'acide monocarboxylique ou dicarboxylique servant de base à l'ester de l'hydroxysuccinimide, de façon en soi connue, en un dérivé réactif tel que le chlorure d'acide ou un anhydride mixte, et par réaction du dérivé réactif, dans un solvant organique, avec le N-hydroxy-succinimide,
10 ou bien

b) par condensation dudit acide monocarboxylique ou dicarboxylique, directement dans un solvant organique polaire, avec le N-hydroxy-succinimide, en présence d'une quantité équimolaire à ce dernier, de cyclohexylcarbodiimide.

15 c) par réaction dudit acide monocarboxylique ou dicarboxylique, sous forme d'un sel alcalin, avec le méthylsulfonate de N-hydroxysuccinimide, en présence d'un composé "couronne" (composé complexe dans lequel un polyéther macrocyclique forme un complexe avec un ion de métal alcalin) comme catalyseur.

20 La fabrication des composés, par l'intermédiaire des anhydrides mixtes dans des solvants organiques tels que, par exemple, le chlorure de méthylène, le furanne, le dioxanne et analogues, s'est révélée, dans de nombreux cas, comme la méthode la meilleure et la plus simple. De préférence, on utilise, com-
25 me dérivé acide réactif, l'anhydride mixte avec l'acide chloroformique. Des substances solubles ou insolubles dans l'eau, solides ou liquides, capables de réagir avec les groupes fonctionnels représentés par X, conviennent comme substances-supports, lors de l'utilisation des composés selon l'invention,
30 pour la fixation covalente des protéines. Des groupes capables de réagir sont, à cet effet, des groupes OH, des groupes amino.

De préférence, on utilise des substances-supports qui sont hydrophiles, facilement gonflables, largement exemptes de charges et stables vis-à-vis des microorganismes.

35 Conformément à une variante préférée du procédé, les composés selon l'invention, lorsque X représente un radical de formule III, sont liés par copolymérisation avec un support, lequel est préparé "in situ" par polymérisation de monomères ou de mélanges de monomères appropriés, ou encore, incorporés dans un support, directement par copolymérisation avec des comonomères
40 appropriés.

Le monomère copolymérisable utilisé dans ce mode de mise en oeuvre peut être soluble dans l'eau ou insoluble dans l'eau. Des monomères solubles dans l'eau sont préférés lorsque le composé de couplage selon l'invention est amené à réagir, tout
5 d'abord avec la protéine biologiquement active, et doit être fixé ensuite, en solution aqueuse homogène au support qui est formé "in situ" par copolymérisation. Au lieu de cette méthode, il est également possible d'opérer suivant les méthodes de polymérisation en suspension ou en émulsion, le produit de cou-
10 plage de la protéine et du composé de formule I selon l'invention, se trouvant dans la phase aqueuse dispersée, et le monomère ou le mélange de monomères insolubles dans l'eau représentant la phase dispersée. Comme comonomères particulièrement préférés, on mentionne des dérivés, solubles ou insolubles dans
15 l'eau, de l'acide acrylique ou de l'acide méthacrylique, comme par exemple, les amides, les nitriles et les esters de ces composés. Parmi les comonomères solubles dans l'eau, l'acrylamide est préféré. Des dérivés non solubles dans l'eau de l'acide acrylique ou de l'acide méthacrylique, en particulier ceux
20 qui sont substitués par des radicaux alcoyle, sont préférés lorsqu'ultérieurement, la protéine liée au support doit être utilisée non pas dans des systèmes purement aqueux, mais dans un milieu organique aqueux. D'autres monomères appropriés dérivent par exemple de l'acide maléique ou fumarique. Les mono-
25 mères utilisables ne sont toutefois pas limités aux composés ci-dessus indiqués à titre d'exemple.

Comme monomères, on peut également utiliser des prépolymérisats renfermant des groupes copolymérisables encore non saturés.

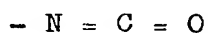
30 Afin de régler les propriétés physiques dans le cas de tels supports préparés par copolymérisation, on ajoute avantageusement des agents réticulants appropriés, en quantités correspondantes. Comme exemples de tels réticulants, on mentionne des composés ayant au moins deux groupes copolymérisables, tels
35 que le N,N'-méthylène-bis-acrylamide et le diacrylate d'éthylène. On peut toutefois également utiliser des réticulants agissant de façon radicalaire, par exemple certains peroxydes organiques.

Lorsqu'on effectue la polymérisation en phase hétérogène,
40 a savoir sous forme de polymérisation en suspension ou en

émulsion, par exemple des réticulants insolubles dans l'eau, tels que le divinylbenzène et le méthacrylate d'éthylène conviennent. De nombreux autres réticulants sont connus de l'homme de l'Art et le choix approprié se fait dans chaque cas, dans le
5 domaine commercial spécialisé. Il est toutefois également possible d'introduire des réticulants, seulement ultérieurement et d'effectuer la réticulation, une fois que la fabrication du support polymère et la liaison avec la protéine active sont déjà réalisées.

10 Si l'on renonce à une réticulation du polymère formé, on obtient des matériaux-soutres solubles ou thermoplastiques. Ceux-ci peuvent être utilisés pour donner des solutions filables ou extrudables, à partir desquelles on peut obtenir, suivant des méthodes en soi connues, les protéines liées au support,
15 par exemple sous forme de fils ou de feuilles.

Pour former la liaison avec des substances-soutres renfermant des groupes hydroxy, il convient d'utiliser en particulier des composés de formule générale I, dans lesquels X est un radical de formule IV. Ce radical forme par chauffage à
20 environ 100°C, dans des solvants organiques tels que le diméthylsulfoxyde par exemple, avec élimination de diéthylamine, l'isocyanate correspondant de formule IVa :



25 lequel réagit à 0°C avec des groupes hydroxy. Dans ces conditions, le groupe ester de l'hydroxysuccinimide (ester "OSu") ne réagit pas encore, de sorte qu'une réaction sélective des deux groupes fonctionnels de la molécule est possible par transformation dans les conditions appropriées à chaque cas.

30 Les composés de formule générale I, dans laquelle X représente un groupe de formule générale II, sont tout d'abord amenés à réagir, par l'intermédiaire du radical "HOSu", avec une substance de faible poids moléculaire ou de haut poids moléculaire renfermant des groupes aminés, puis amenés encore à
35 réagir, en solution aqueuse acide faible. Dans ces conditions, il se forme, à partir de l'acétal, l'aldéhyde libre, lequel réagit ultérieurement de façon connue de l'homme de l'Art, par exemple avec des groupes aminés, avec formation d'une base de Schiff, laquelle est ensuite réduite, avec formation d'une
40 liaison covalente, par exemple avec le borohydrure de sodium,

ou par réaction analogue avec des dérivés d'hydroxylamine, d'hydrazine ou de semicarbazide.

Comme supports, on peut utiliser par ailleurs, des substances solides ne présentant aucun emplacement apte à réagir avec les groupes fonctionnels des composés selon l'invention. Dans de tels cas, les composés selon l'invention sont utilisés comme réticulants. A cet effet, la protéine active est avantageusement amenée à la surface du corps-support, ^{exemple par} par/adsorption, enduction par une solution de protéine ou analogue, puis l'accrochage est effectué sur cette surface, par réticulation avec un composé selon l'invention, en utilisant à cet effet, de préférence les dérivés homodifonctionnels, par conséquent les dérivés dans lesquels X représente un autre groupe ester de carboxysuccinimide, des composés dans lesquels X correspond à la formule IV pouvant toutefois être également utilisés pour la réticulation.

Suivant un autre mode de mise en oeuvre préféré de l'application, selon l'invention, des nouveaux composés, on fait réagir la protéine biologiquement active, aussi bien avec un composé homodifonctionnel, qu'avec un composé hétérodifonctionnel de formule I. Par exemple, on fait réagir la protéine, tout d'abord avec un composé dans lequel X est un groupe de formule générale III. Ceci conduit à l'introduction de restes copolymérisables. Ensuite, on ajoute un composé réticulable, de préférence un composé homodifonctionnel, dans lequel X représente par conséquent un autre groupe ester de carboxysuccinimide. Ceci conduit à une réticulation, c'est-à-dire à l'association de plusieurs molécules entre elles. Ce modèle complexe comprenant plusieurs unités de protéines peut être fixé sur un support, comme précédemment décrit, au moyen de radicaux copolymérisables qui y sont accrochés, suivant les méthodes précitées de copolymérisation de protéines. De même, il est également possible d'introduire suivant cette méthode, à la place d'un groupe copolymérisable, un groupe de formule II ou IV et d'effectuer la liaison avec un support préalablement formé.

Suivant une autre variante, la protéine est d'abord réticulée avec liaison de plusieurs molécules de protéines entre elles, puis l'on effectue seulement après, l'immobilisation sur un support, avec le même ou un autre composé de formule I.

Des protéines biologiquement actives, pouvant être liées par covalence avec les composés selon l'invention, sont des

protéines à activité enzymatique, des protéines à activité immunologique, telles que les anticorps, l'immunoglobuline et analogues, ainsi que des protéines à activité hormonale.

Les nouveaux composés selon l'invention sont remarquables
5 par leur aptitude réactionnelle vis-à-vis des protéines, ce qui permet d'aboutir, en solution aqueuse ou organo-aqueuse, à la formation de liaisons covalentes, tout en conservant dans une large mesure, l'activité biologique, ainsi que par leur aptitude
10 réactionnelle avec des doubles liaisons copolymérisables, des groupes hydroxy et des groupes amino, et d'autres groupes actifs qui se trouvent sur des substances-soutiens pour les protéines. Un autre avantage de ces esters est leur bonne aptitude à cristalliser, ce qui permet de les isoler facilement sous forme pure.

15 Ils sont en mesure de former avec de tels soutiens, des liaisons covalentes, dans des conditions dans lesquelles l'activité biologique des protéines reste obtenue. En outre, ils peuvent être facilement modifiés à volonté quant à leurs propriétés hydrophiles ou hydrophobes. Par exemple, les esters de
20 bis-hydroxysuccinimides symétriques peuvent être ajoutés en quantités appropriées dans chaque cas à la solution d'une protéine, dans un tampon faiblement alcalin. Les protéines réticulées, biologiquement actives, ainsi obtenues peuvent être, soit séparées, par exemple par dialyse, ultra-filtration et analogues, détachées l'une de l'autre, par exemple par chromatographie sur gel, soit amenées à réagir, par exemple, par liaison à
25 un soutien ou polymérisation unique en un tel soutien. Les composés selon l'invention, dérivés de l'éthylèneglycol sont supérieurs, en raison de leur caractère hydrophile, aux esters
30 simples d'acides dicarboxyliques-hydroxysuccinimide. Par suite de leur meilleure solubilité dans l'eau, ils réagissent plus rapidement et la dénaturation de la protéine biologiquement active est réprimée.

Dans les composés dissymétriques (hétérodifonctionnels), il
35 est possible par exemple, de transformer le groupe amidoacétaldéhydeacétal, après couplage du groupe hydroxysuccinimide avec une protéine, par acidification, en l'aldéhyde libre, lequel est alors amené à réagir, comme précédemment décrit, avec une autre substance renfermant des groupes aminés.

40 On peut donc associer, par exemple, aussi bien deux enzymes

différentes entre elles, ou une enzyme à l'albumine, ou un antigène à l'albumine de sérum de bovidé, ou à un acide polyaminé tel que la polylysine.

Les composés renfermant une double liaison copolymérisable peuvent être utilisés par exemple suivant les méthodes décrites dans la demande de brevet publiée après examen DT-AS 21 30 913 ou la demande de brevet publiée avant examen DT-OS 21 28 743, pour la copolymérisation de protéines. De même, il est possible de soumettre ces composés, en premier lieu à une copolymérisation, ce qui conduit à la formation, suivant le choix du comonomère, à des copolymères plus ou moins bien solubles dans l'eau. Les protéines peuvent alors être liées à ces copolymères préparables avec des poids moléculaires quelconques, par l'intermédiaire du groupe ester d'hydroxysuccinimide.

Les exemples suivants, non limitatifs, servent à illustrer l'invention.

1. Ethylèneglycol-bis-propionate de bis-hydroxysuccinimide.

A une solution de 10,3 g d'acide éthylèneglycol-bis-propionique (préparé selon R.V. Christian et R.M. Hixon, J. Amer. Chem. Soc. 70 (1948), 1333, Doc. No 12916) et de 12,6 g de N-hydroxysuccinimide dans 150 ml de tétrahydrofurane absolu, on introduit goutte à goutte, sous agitation et refroidissement à la glace, pendant 1 heure, une solution de tétrahydrofurannique de 22,7 g de diocyclohexylcarbodiimide. On agite la solution pendant 18 heures à température ambiante. On ajoute ensuite 0,3 ml d'acide acétique. Après une heure supplémentaire, on ajoute 150 ml d'acétate d'éthyle absolu, puis on filtre pour séparer la dicyclohexylurée précipitée. On concentre le filtrat d'un tiers, on lave à l'eau, au bicarbonate et de nouveau à l'eau, on sèche sur sulfate de sodium et l'on concentre. On reprend le produit par l'acétonitrile, on laisse reposer 24 heures à +4°C, puis on sépare par filtration l'urée de nouveau précipitée, et l'on concentre de nouveau. A partir de l'huile résiduelle, le produit indiqué au titre de cet exemple cristallise, après avoir laissé reposer pendant plusieurs jours à +4°C. Ce produit est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle.

Rendement : 25%

Point de fusion : 115°C

$C_{16}H_{20}N_2O_{10}$ (400,35) Calculé : C 47,99 H 5,04 N 6,99

Trouvé : C 47,95 H 5,04 N 6,87

2. De façon analogue à l'exemple 1, on prépare l'oxy-bis-propionate d'hydroxysuccinimide.

Rendement : 30%

5 Point de fusion : 131°C.

3. Diméthylacétal de l'acide oxysuccininidoglutarique-amino-acétaldéhyde.

A une solution de 11,4 g d'anhydride glutarique dans 100 ml de tétrahydrofuranne, on ajoute goutte à goutte, en même temps, 10,1 g de triéthylamine et 13,2 g de diméthylacétal de l'acétaldéhyde et l'on agite ensuite pendant encore 30 minutes. La solution formée est refroidie à +5°C et additionnée lentement de 9,5 ml de chloroformiate d'éthyle. On maintient le mélange encore 30 minutes à -5°C. On ajoute ensuite, goutte à goutte, à 0°C, en même temps, 11,5 g d'hydroxysuccinimide et 14,0 ml de triéthylamine. Après un temps de réaction de 5 heures à + 25°C, on filtre pour séparer le chlorure de triéthylammonium précipité, on concentre, on reprend dans de l'acétate d'éthyle, on lave à l'eau, au bicarbonate et de nouveau à l'eau, on sèche sur sulfate de sodium et l'on concentre. Le produit indiqué au titre de cet exemple est recristallisé à partir de l'acétate d'éthyle chaud.

Rendement : 45%

Point de fusion : 70°C

25 $C_{13}H_{20}N_2O_7$ (316,3) Calculé : C 49,60 H 6,38 N 8,35

Trouvé : C 49,34 H 6,37 N 8,81

4. Méthacrylolyl-w-hydroxycarboxylates d'oxysuccinimide.

Les acides méthacrylolyl-w-oxycarboxyliques sont préparés de façon analogue au procédé décrit dans "Makromol. Chem.", 176, 3017 (1973). Dans un ballon à trois tubulures de 500 ml, on place 0,1 mole de l'acide méthacrylolyl-hydroxylique choisi et 0,11 mole de N-hydroxysuccinimide dans un mélange de chlorure de méthylène absolu et de tétrahydrofuranne absolu, et l'on refroidit au bain de glace à +5°C. On ajoute ensuite goutte à goutte, sous agitation, une solution de 0,11 mole de dicyclohexylcarbodiimide dissous dans 50 ml de chlorure de méthylène absolu. On agite encore pendant environ 12 heures, la température monte alors à + 25°C. On sépare par filtration la dicyclohexyl-urée précipitée et l'on concentre le filtrat. L'huile formée est recueillie dans l'acétonitrile et on laisse reposer

plusieurs heures dans l'armoire frigorifique. On sépare l'urée nouvellement précipitée et l'on évapore l'acétonitrile. Le produit est ainsi obtenu sous forme d'une huile.

5. N-2-hydroxyéthyl-N',N'-diméthylurée-succinate d'hydroxy-succinimide.

On dissout 13,2 g de N-2-hydroxyéthyl-N',N'-diméthylurée dans du THF absolu. On ajoute ensuite, goutte à goutte, 2,4 g d'une suspension d'hydruure de sodium, en l'espace d'à peine 5 minutes. On agite à température ambiante jusqu'à la fin du dégagement d'hydrogène et l'on ajoute 10 g d'anhydride succinique. Après nouvelle agitation pendant 24 heures, on concentre et l'on ajoute de l'eau. Après la fin du dégagement de H₂, on sépare les fractions organiques, on acidifie la solution et l'on extrait avec du chlorure de méthylène. La phase organique est séchée et concentrée, ce qui laisse une huile résiduelle jaune clair.

Rendement : 53% de la théorie.

A partir de cet acide, on prépare l'ester avec l'hydroxy-succinimide de façon analogue à l'exemple 4.

Rendement : 35% de la théorie ; point de fusion : 97 - 98°C.

Analyse :	C	H	N
calculé :	47,5	5,8	12,8
Trouvé :	47,5	5,8	12,8

Par chauffage à environ 100°C dans le diméthylsulfoxyde, on sépare la diéthylamine, avec formation de l'isocyanate correspondant.

Exemples d'application.

6. Stabilisation de la trypsine par réticulation avec différents composés symétriques bifonctionnels.

a) Essai comparatif.

On fait réagir la trypsine, dans un premier essai, avec l'aldéhyde glutarique et, dans un second essai, avec le chlorhydrate du bis-imidoester de l'acide subérique, et l'on compare la chute d'activité de la trypsine ainsi réticulée, avec celle de la trypsine libre. On ajoute pour chaque fraction de 50 mg de trypsine dans 25 ml d'eau distillée, 2 µM de la substance réticulante dissoute dans un tampon au phosphate 0,05 M (pH 7,5) et l'on agite à température ambiante. Au bout de 20 heures, l'activité de la trypsine libre ainsi que celle de la trypsine réticulée avec l'aldéhyde glutarique tombe à

15% de l'activité initiale. Au bout de 50 heures, l'activité tombe à 0 pour les trois essais. La trypsine réticulée avec le chlorhydrate de bis-imidoester de l'acide subérique présente, après 20 heures, encore 50%, après 50 heures, encore 30% et après 100 heures, encore 20% de l'activité initiale.

L'essai est répété avec les esters selon l'invention des exemples 2 et 3. Au bout de 20 heures, l'activité avec le composé de l'exemple 3 atteint encore 85%, et avec celui de l'exemple 4, encore 50%. Au bout de 50 heures, l'activité de la trypsine réticulée avec le composé de l'exemple 2 atteint 43%, et 27% avec le composé de l'exemple 3. Au bout de 100 heures, on mesure encore une activité de 25% avec le composé de l'exemple 2. Cet exemple montre la supériorité des composés selon l'invention par rapport aux agents de réticulation connus.

7. Stabilisation de l'acylase du rein par réticulation.

L'activité de l'acylase du rein en tampon phosphate 0,1 M (pH 4) s'abaisse à la valeur 0, malgré un refroidissement à 4°C, en l'espace de 3 à 5 jours. Si par contre on ajoute le composé de l'exemple 1 ou du subérate de bis-hydroxysuccinimide (préparé de façon analogue à l'exemple 1), il se produit une chute initiale d'activité de 70 à 50%. Cette activité durable a été contrôlée pendant 2 mois et demeure constante durant cette période. Ce résultat a été constamment obtenu en faisant varier le rapport molaire protéine/ester entre 1:1 et 1:8.

Un essai comparatif avec utilisation de dialdéhyde glutarique à la place du bis-ester selon l'invention, n'a conduit à aucune stabilisation.

8. Immobilisation de l'acylase du rein par copolymérisation.

On dissout 1000 mg d'aminoacylase (lyophilisat), activité spécifique : 17,0 U/mg, dans 25,0 ml de tampon Tris, pH 8,3, 1 M, à +4°C. On y ajoute 2,5 ml d'une solution de 30,7 mg de méthacrylhydroxycapronate d'hydroxysuccinimide, exemple 4, dans le dioxanne.

Temps de réaction : 12 heures ; température : +4°C.

On dissout 6 g d'acrylamide, 0,5 g de N,N'-méthylène-bis-acrylamide et 0,6 ml d'une solution de CoCl_2 à 1% dans 22 ml du tampon Tris précité. Après addition de la solution vinylée de l'enzyme, on démarre la polymérisation avec 1,5 ml d'une solution de peroxydisulfate d'ammonium à 5% et de 3-diméthylaminopropionitrile à 5%.

Le gel formé est pressé à travers un tamis (ouverture de maille 0,4 mm) et élué sur colonne avec un tampon phosphate 1 M, pH 7,5.

5 1er éluat : 2 l. de tampon 1,88% d'activité dans l'éluat
activité spécifique sur le gel
193,1 U/g

2ème éluat : 2 l. de tampon 1,88% d'activité dans l'éluat
activité spécifique sur le gel
193,1 U/g

10 Rendement en l'activité : 6,9%.

L'exemple a été répété en utilisant le chlorure acryloyle à la place du composé selon l'invention. Aucune activité n'a pu être liée au support.

15 9. Immobilisation de la glucoseoxydase (GOD) par réaction en deux stades avec les composés selon l'invention et copolymérisation subséquente.

20 Comme décrit dans l'exemple 8, on incube préalablement la GOD d'une activité spécifique d'environ 210 U/mg avec le composé de l'exemple 4, puis on ajoute une petite quantité de composé de l'exemple 1. On laisse ensuite reposer 24 heures et l'on effectue ultérieurement la copolymérisation comme décrit dans l'exemple 8.

Dans le gel obtenu, on a mesuré une activité de 290 U/g.

25 En répétant cet essai, avec utilisation de chlorure acryloyle à la place des composés de l'invention, on obtient une activité de 235 U/g.

10. Couplage de l'angiotensine au RSA (albumine du sérum de bovin).

30 On dissout 25 mg d'angiotensine dans 10 ml de dioxanne/eau (1:1) et l'on ajoute une solution de 6 mg de composé de l'exemple 4 dans le dioxanne. On amène ensuite le pH à 8,0 par addition d'une solution de K_2CO_3 à 5% et l'on agite pendant 2 jours à température ambiante. On précipite le produit par addition de tétrahydrofurane, on sépare par centrifugation et on lyophilise.

35 Rendement : 19,6 mg.

On amène à pH 4 les 19,6 mg de ce produit intermédiaire et l'on agite pendant 1 heure. On ajuste ensuite le pH de nouveau à 8,0 et l'on additionne la solution de 16,6 mg de RSA.

40 Après agitation pendant 1 heure, on ajoute 1 mg de borohydrure de sodium. Après 20 minutes supplémentaires, on ajoute encore

1 mg. Après 60 minutes supplémentaires, la réaction est terminée. La solution est concentrée, reprise dans l'éthanol absolu, filtrée, additionnée d'eau et dialysée 4 jours. A partir du dialysat, on obtient 24,1 mg de lyophilisat. Il en résulte qu'au
5 moins 24 molécules d'angiotensine sont couplées avec 1 molécule de RSA.

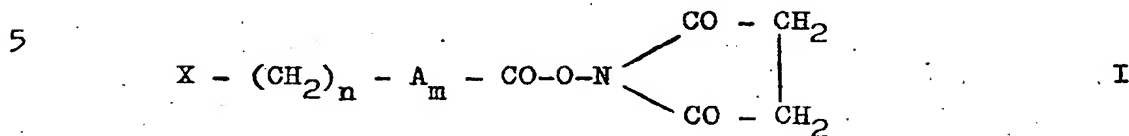
11. Copolymérisation du méthacryloyl-hydroxycarboxylate d'hydroxy-succinimide avec le méthacrylamide.

10 On prépare une solution exempte d'oxygène (1 mole/dm^3) des deux monomères dans le tétrahydrofurane absolu. (rapport de monomère ester : amide = 1:5). La polymérisation s'effectue par addition de 0,8% (mole/mole) d'AIBN (dinitrile de l'acide azoisobutyrique) à 58°C. Au bout de 4 heures, la polymérisation est interrompue par refroidissement (immersion dans un bain de
15 glace) et l'on sépare, par essorage, le polymère précipité. On redissout dans l'eau et on reprécipite en versant goutte à goutte dans l'acétone.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de
20 ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes.

REVENDICATIONS

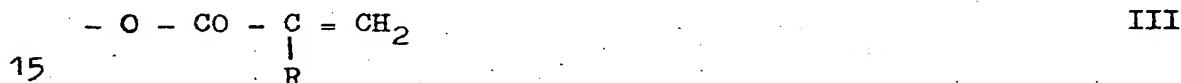
1. Dérivés esters de l'hydroxysuccinimide de formule générale (I)



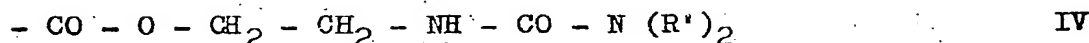
dans laquelle X représente un autre groupe ester carboxysuccinique, ou un radical de formule générale :



ou :



ou :



A est un groupe $-\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2-$, lorsque n est égal à 2 et X est un autre groupe ester carboxysuccinimide, et sinon une liaison simple,

n est un nombre entier ayant une valeur de 2 à 7

m est le nombre 1, 2, 3 ou 4,

R est un atome d'hydrogène, un groupe méthyle ou cyanure, et R' est un groupe méthyle ou éthyle.

2. Procédé de fabrication d'un composé de formule générale I, caractérisé par le fait que l'on transforme l'acide mono- ou di-carboxylique servant de base à l'ester d'hydroxysuccinimide, de façon en soi connue, en un dérivé réactif tel que le chlorure d'acide ou un anhydride mixte et en ce que l'on fait réagir ce dérivé réactif avec le N-hydroxysuccinimide dans un solvant organique.

3. Procédé de fabrication d'un composé de formule générale I, caractérisé par le fait que l'on condense directement, dans un solvant organique polaire, l'acide mono- ou di-carboxylique servant de base à l'ester d'hydroxysuccinimide, avec le N-hydroxysuccinimide, en présence d'une quantité équimoléculaire à ce dernier de cyclohexylcarbodiimide.

4. Procédé de fabrication d'un composé de formule générale I, caractérisé par le fait que l'on fait réagir l'acide mono-

ou di-carboxylique servant de base à l'ester d'hydroxysuccinimide, sous forme de sel alcalin, avec le méthylsulfonate de N-hydroxysuccinimide en présence d'un composé "couronne" comme catalyseur.

5 5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on prépare comme dérivé d'acide réactif, l'anhydride mixte avec l'acide chloroformique.

6. Application d'un composé selon la revendication 1, à la liaison de protéines biologiquement actives, entre elles et/ 10 ou à des substances-soutports liquides ou solides.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)